

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. Mai 2004 (21.05.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/042393 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/50, C12N 5/00 (74) Anwalt: WEICKMANN & WEICKMANN; Postfach 860 820, 81635 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/012428 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum:
6. November 2003 (06.11.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
102 51 879.3 7. November 2002 (07.11.2002) DE (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): CELL CONTROL DIAGNOSTICS GMBH & CO. KG [DE/DE]; Am Klopferspitz 19, 82152 Planegg-Martinsried (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BABARINA, Alexandra [DE/DE]; Cammerloherstrasse 3, 80686 München (DE). WALDENMAIER, Dirk, Sebastian [DE/DE]; Reichenbachstrasse 24, 80469 München (DE). KISCHKEL, Frank, Christian [DE/DE]; Jahnstrasse 5, 32312 Lübbecke (DE).
- Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 2004/042393 A1

(54) Title: MEDIUM AND METHOD FOR MEASURING THE EFFICACY OF A TUMOUR THERAPY

(54) Bezeichnung: MEDIUM UND VERFAHREN ZUR MESSUNG DER WIRKSAMKEIT EINER TUMORTHERAPIE

(57) Abstract: According to the invention, a measurement of the efficacy of a tumour therapy in single cell suspensions of tumour cells, by determination of the acid formation in a medium in the presence and the absence of a cytotoxic substance, is carried out by performing the measurement in a medium comprising 0.1 to 1 mM of a pH 7.0 to 7.4 buffer, 2 to 10 g/l glucose, 2 to 5 mM glutamine as the carbon source and 5 to 20 vol. % fetal calf serum.

(57) Zusammenfassung: Zur Messung der Wirksamkeit einer Tumorthherapie an Einzelzellsuspensionen von Tumorzellen durch Bestimmung der Säurebildung in einem Medium in Gegenwart und in Abwesenheit einer cytostatisch oder cytotoxisch wirksamen Substanz führt man die Messung in einem Medium durch, das 0,1 bis 1 mM Puffer pH 7,0 bis 7,4 2 bis 10 g/l Glucose, 2 bis 5 mM Glutamin als Kohlenstoffquelle und 5 bis 20 % Vol.-% fötales Kälberserum enthält.

Medium und Verfahren zur Messung der Wirksamkeit einer Tumorthherapie**Beschreibung**

5

Die Erfindung betrifft ein Medium zur Messung der Wirksamkeit einer Tumorthherapie an Einzelzellsuspensionen sowie ein Verfahren zur Messung der Wirksamkeit einer Tumorthherapie unter Verwendung dieses Mediums.

10 Um die Wirksamkeit von Tumorthapien zu testen, wäre es wünschenswert, an einer isolierten Tumorzelle den Einfluss einer Tumorthherapie auf die Lebensfähigkeit dieser Zelle bestimmen zu können. Ein solches Verfahren würde es ermöglichen, bei einem Patienten vorab festzustellen, ob eine bestimmte Therapie bei seinem speziellen Tumor

15 wirksam ist oder nicht. Hierzu wären Tumorteile zu entnehmen, durch enzymatischen Verdau in eine Einzelzellsuspension zu überführen und dann die Lebenstätigkeit der so erhaltenen Einzelzellen unter dem Einfluss der Therapie, typischerweise also des Chemotherapeutikums, zu bestimmen. Ein Vergleich der Stoffwechselaktivität von nicht behandelten Tumorzellen

20 mit der Stoffwechselaktivität von therapeutisch behandelten Tumorzellen lässt dann die Wirksamkeit der Therapie anhand der verringerten Stoffwechselaktivität der behandelten Zelle im Vergleich zur unbehandelten Tumorzelle, direkt bestimmen. Auf diese Weise wäre es möglich innerhalb kürzester Zeit bei einem bestimmten Tumor festzustellen, welche Therapie

25 geeignet oder weniger geeignet ist zur Behandlung des Patienten.

Ein entscheidendes Problem für ein derartiges Verfahren ist es jedoch, in der Zellsuspension die Bedingungen so einzustellen, dass die vereinzelter Tumorzellen eine maximale Stoffwechselaktivität entfalten können. Erst

30 dadurch kann eine Verringerung der Stoffwechselaktivität noch mit ausreichender Genauigkeit gemessen werden. Aus einem kompakten Tumorgewebe durch enzymatischen Verdau hergestellte

- 2 -

Einzelzellsuspensionen der Tumorzellen weisen jedoch in den bekannten Medien äußerst geringe Stoffwechselaktivitäten auf, sodass es nur sehr schwer oder gar nicht möglich ist, eine weitere Verringerung der Stoffwechselaktivität mit hinreichender Genauigkeit zu bestimmen.

5

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Zellkulturmedium zur Verfügung zu stellen, welches auf diese Weise hergestellten Einzelzellsuspensionen von Tumoren eine maximale Stoffwechselaktivität und Lebensdauer zu verleihen und ein Verfahren zur Beurteilung einer Tumorthherapie mit diesem Medium zu schaffen.

10

Gelöst wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch ein Medium zur Messung der Wirksamkeit einer Tumorthherapie an Einzelzellsuspensionen enthaltend die essenziellen Aminosäuren, Vitamine, Salze und Kohlenstoffdonatoren, dadurch gekennzeichnet, dass das Medium 0,1 bis 1 mM Puffer pH 7,0 bis 7,4, 2 bis 10 g/l Glucose und 2 bis 5 mM Glutamin als Kohlenstoffquellen und 5 bis 20 % fötales Kälberserum enthält.

15

Von bekannten Medien unterscheidet sich das erfindungsgemäße Medium durch eine sehr geringe Pufferkapazität, einen höheren Gehalt an Glucose, Glutamin und fötalem Kälberserum. Andere Kohlenstoffquellen außer Glucose und Glutamin und weitere Puffer enthält das Medium vorzugsweise nicht.

20

Die Zusammensetzung des erfindungsgemäßen Mediums richtet sich in gewissem Maße nach den metabolischen Eigenschaften der in dem untersuchten Tumor enthaltenen Zellen. Die Einstellung der Variablen im erfindungsgemäßen Medium strebt dabei an für die Tumorzellen die Bedingungen der Glycolyse einzustellen, da hierbei eine hohe pH-Wert-Änderung zu erwarten ist. Gleichzeitig sollen die in der Suspension unvermeidlicherweise ebenfalls enthaltenen normalen Zellen nach

25

30

- 3 -

Möglichkeit im aeroben Metabolismus gehalten werden und dadurch eine vernachlässigbar geringe Wirkung auf den pH-Wert ausüben.

Da Tumorzellen mehr Glucose verbrauchen als viele nicht-Tumorzellen und
5 andererseits bei Tumorzellen die Erreichung einer möglichst hohen Glycolyse angestrebt wird, bei der die Protonenbildung und damit die Ansäuerung des Mediums pro produziertes ATP-Molekül am höchsten ist, beträgt die Glucosemenge im erfindungsgemäßen Medium vorzugsweise mehr als 2 g/l, besonders bevorzugt 4 bis 6 g/l Glucose. Andere
10 Kohlenstoffquellen, ausgenommen das als essenzieller Bestandteil des Mediums vorliegende Glutamin, sollen vorzugsweise nicht enthalten sein. Typische Beispiele für derartige unerwünschte Kohlenstoffquellen sind Pyruvat, Lipide und ähnliche bekannte Kohlenstoffquellen in Nährmedien. Insbesondere Lipide erwiesen sich in Kombination mit Glutamin als
15 schädlich, da hierdurch die Anfangsaktivität aller Tumorzellen stark gesenkt wird.

Die besten Ergebnisse hinsichtlich Steigerung der Aktivität der Tumorzellen bei gleichzeitig geringstmöglichem Einfluss der nicht-Tumorzellen auf die
20 pH-Wertänderung ergab daher einen Gehalt von 5 g/l Glucose, 2 mM Glutamin und 10 Vol.-% fötales Kälberserum, wobei jeder dieser drei Werte $\pm 10\%$ schwanken kann.

Das erfindungsgemäße Medium kann durch Aufbau aus den Komponenten
25 hergestellt werden. Beispielsweise können übliche Vitaminmischungen und Proteinhydrolysate als Quelle der essenziellen Aminosäuren mit den oben genannten essenziellen Mengen an Glucose, Glutamin, Puffer und fötalem Kälberserum aufgebaut werden. Alternativ kann auch von bekannten Medien ausgegangen und deren Zusammensetzung durch Zugabe der
30 wichtigen Mengen an essenziellen Bestandteilen wie oben erläutert, ergänzt werden. Insbesondere eignet sich hierzu das RUN-Medium als Ausgangsbasis. Ferner kann das Medium Antibiotika enthalten.

- 4 -

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Messung der Wirksamkeit einer Tumorthherapie an Einzelzellsuspensionen von Tumorzellen durch Vergleich der Säurebildung in einem Medium bei therapierten und nicht therapierten Tumorzellen, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man die Messung in einem Medium wie
5 vorstehend beschrieben durchführt. Das Verfahren eignet sich gut zur Durchführung unter Verwendung handelsüblicher Vorrichtungen wie beispielsweise dem Cytosensor®-Mikrophysiometer der Firma Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA., USA, ist aber nicht hierauf beschränkt.

10 Letztere Vorrichtung und deren Verwendung zur Analyse von Zellmembran- gebundenen Rezeptoren ist aus Biosensors & Bioelectronics 15 (2000) 149-158 bekannt, wobei die durch die physiologischen Effekte solcher Rezeptoren hervorgerufenen pH-Änderungen gemessen werden als Maß für
15 die metabolischen Effekte.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Messung der Wirksamkeit einer Tumorthherapie wird nachfolgend beispielsweise unter Verwendung des Cytosensor®-Mikrophysiometers beschrieben.

20 Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Verwendung des erfindungsgemäßen Mediums wird eine Probe des zu untersuchenden Tumors entnommen und in bekannter Weise durch enzymatischen Verdau in eine Einzelzellensuspension überführt. Die Zellen werden aus dem
25 Verdaumedium abgetrennt und dann deren pH-Kurve in dem erfindungsgemäßen Medium aufgenommen. Ein typisches Medium gemäß der Erfindung weist z.B. die aus der nachstehenden Tabelle 1 zu entnehmende Zusammensetzung auf.

30

- 5 -

Tabelle 1

	Konzentration mg/l	Substanz
5	4,45	Alanin, L-
	147,5	Arginin L-, HCL
	7,5	Asparagin, L-, H2O
	6,65	Asparaginsäure, L-
	24	Cystin, L-
10	17,56	Cystein, L-, HCL, H2O
	7,35	Glutaminsäure, L-
	18,75	Glycin
	31,48	Histidin, L-, HCl H2O
	20	Hydroxyprolin, L-4-
15	54,45	Isoleucin, L-
	59,05	Leucin, L-
	91,25	Lysin, L-HCl
	17,24	Methionin, L-
	35,48	Phenylalanin, L-
20	17,25	Prolin, L-
	26,25	Serin, L-
	53,45	Threonin, L-
	9,02	Tryptophan, L-
	38,7	Tyrosin, L-
25	52,85	Valin, L-
	2000	D+ Glucose
	12,6	Inosit, myo-, inosit, meso-
	0,00365	Biotin, D-
	2,24	Calcium D-Pantothenat
30	8,98	Cholinchlorid
	1	Glutathion, L-, reduziert
	2,02	Nicotinsäureamid

- 6 -

	2,031	Pyridoxin, HCL
	2,17	Thiaminchlorid, Thiamin HCL
	0,01	Tocopherolsuccinat DL-alfa
	0,1	Vitamin A-acetat
5	0,68	Vitamin B 12 (Cyanocobalamin)
	2	Vitamin C (Ascorbinsäure)
	0,1	Vitamin D2
	8,1	Phenolrot
	154	Calciumchlorid . 2 H2O
10	0,05	Eisen (III) nitrat, 9 H2O
	0,417	Eisen (II) Sulfat, 7 H2O zur Analyse
	311,8	Kaliumchlorid
	0,00125	Kupfer (II) sulfat, 5 H2O
	100	Magnesiumsulfat, 7 H2O
15	61	Magnesiumchlorid, 6 H2O
	6999,5	Natriumchlorid
	14,2	di-Natriumhydrogenphosphat (anhyd.)
	0,43	Zinksulfat, 7 H2O
	2 mM	Glutamin
20	10 Vol.-%	fötales Kälberserum
	100 Units/ml	Penicillin
	100 µg/ml	Streptomycin
	100 µg/ml	Kanamycin
	2,5 µg/ml	Fungizone

25

Hierzu werden die so erhaltenen Einzelzellen dann vorzugsweise auf einer pH-Elektrode immobilisiert. Die Immobilisierung kann durch geeignete Substanzen wie sie in der Zellkultur üblich sind, erfolgen. Als gut geeignet hat sich Agarose herausgestellt, welches die gewonnen Einzelzellen auf der Elektrodenoberfläche immobilisieren kann aber auch andere in der Zellkultur verwendete Immobilisierungsmittel sind brauchbar.

30

- 7 -

Das verwendete Gerät weist acht Kanäle auf, in denen simultan der pH-Wert in Durchflusszellen bestimmt werden kann. In jedem Kanal ist eine pH-Elektrode angeordnet, auf der sich die immobilisierte Zellsuspension befindet. Über diese immobilisierte Zellsuspension wird dann durch eine
5 Pumpe für einen geeigneten Zeitraum das erfindungsgemäße Medium gepumpt und gleichzeitig mit der pH-Messung begonnen. In einem typischen Fall dauert ein Messzyklus 120 Sekunden. Davon wird 90 Sekunden lang nur Medium zugepumpt und jede Sekunde ein pH-Wert bestimmt. Danach wird über 30 Sekunden die pH-Wert-Änderung
10 gemessen. Dieser Vorgang wird über einen längeren Zeitraum, in der Regel 14 bis 24 Stunden, fortgesetzt, sodass sich schließlich eine pH-Wert-Kurve ergibt, welche der metabolischen Aktivität der immobilisierten Zellen direkt äquivalent ist.

15 Im oben angegebenen Gerät finden sich wie oben erwähnt, acht parallele Kanäle. Zur Bestimmung der Wirksamkeit einer Tumorthherapie wird zweckmäßig in einem Kanal zur Bestimmung einer Basismesskurve nur erfindungsgemäßes Medium durchgepumpt, in den anderen Kanälen können verschiedene Antitumormittel (Cytostatika) gleichzeitig bestimmt
20 werden. Da die Cytostatika, wenn sie gegenüber den hier verwendeten Tumorzellen eine Wirksamkeit entfalten, zu einer Herabsetzung der metabolischen Aktivität führen, erhält man eine pH-Wert-Kurve über die Zeit, welche in Folge der verringerten metabolischen Aktivität durch die Cytostatikaeinwirkung eine geringere pH-Wert-Änderung zur Folge hat. Aus
25 dem Vergleich der Kurvenneigungen, die dann bei den in Gegenwart von Cytostatika gemessenen Kurven im Vergleich zu der Cytostatika-freien Messkurve gewonnen werden, lässt sich direkt die Aktivität der jeweils untersuchten cytostatisch wirksamen Verbindungen bestimmen. In gleicher Weise ist es auch möglich, nicht in den verschiedenen Kanälen
30 verschiedene cytostatisch oder cytotoxisch wirksamen Verbindungen zu untersuchen sondern für ein bestimmtes Cytostatikum unterschiedliche Konzentrationen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit zu untersuchen. Letztere

- 8 -

Ausführungsform hat den Vorteil, dass evtl. Einflüsse des untersuchten Cytostatikums auf den pH-Wert durch Anpassung des Mediums im Rahmen der erfindungsgemäßen Grenzwerte insbesondere hinsichtlich der Pufferkapazität ausgeglichen werden können. Die Pufferkapazität als solche wird möglichst gering gehalten, darf jedoch 0,1 mM nicht unterschreiten. Vorzugsweise wird die Puffermenge möglichst nahe an diesem unteren Grenzwert eingestellt. Bei Cytostatika, die selbst den pH-Wert beeinflussen können, kann jedoch dann die Puffermenge erhöht werden bis maximal 1 mM.

Erfindungsgemäß wird es möglich, innerhalb sehr kurzer Zeit die Wirksamkeit einer Tumorthherapie bei einem Patienten extrakorporal zu messen und aufgrund der Messergebnisse dann die Behandlung entsprechend einzustellen. Damit wird nicht nur ein entscheidender Zeitgewinn bei der Behandlung des Patienten ermöglicht sondern auch das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen der Therapie ohne entsprechende Wirksamkeit gegenüber dem Tumor selbst verringert oder ganz vermieden. Dies bedingt einen erheblichen Fortschritt bei der Tumorthherapie.

Ansprüche

1. Medium zur Messung der Wirksamkeit einer Tumorthherapie an Einzelzellsuspensionen, enthaltend die essenziellen Aminosäuren, Vitamine, Salze und Kohlenstoffdonatoren,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Medium 0,1 bis 1 mM Puffer pH 7,0 bis 7,4, 2 bis 10 g/l Glucose, 2 bis 5 mM Glutamin als Kohlenstoffquelle und 5 bis 20 Vol.-% fötales Kälberserum enthält.
2. Medium nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass es als Puffer Phosphatpuffer enthält.
3. Medium nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass es 8 bis 12 Vol.-% fötales Kälberserum enthält.
4. Medium nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Medium 5 g/l Glucose, 2 mM Glutamin und 10 Vol.-% fötales Kälberserum enthält, wobei jeder dieser Werte um 10 % abweichen kann.
5. Medium nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Medium 5 g/l Glucose, 2 mM Glutamin und 10 Vol.-% fötales Kälberserum enthält, wobei jeder dieser Werte um 10 % abweichen kann.

- 10 -

6. Verfahren zur Messung der Wirksamkeit einer Tumorthherapie an Einzelzellsuspensionen von Tumorzellen durch Bestimmung der Säurebildung in einem Medium in Gegenwart und in Abwesenheit einer cytostatisch oder cytotoxisch wirkamen Substanz,
5 dadurch gekennzeichnet,
dass man die Messung in einem Medium nach einem der Ansprüche 1 bis 4 durchführt.
7. Verfahren nach Anspruch 6,
10 dadurch gekennzeichnet,
dass man die Messung mittels einer pH-Elektrode, auf welcher die Einzelzellsuspension immobilisiert ist, durchführt unter Verwendung einer Durchflusszelle, welche von dem erfindungsgemäßen Medium durchströmt wird.
- 15 8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass man das Medium durch die Durchflusszelle pumpt bis sich ein konstanter pH-Wert eingestellt hat und dann durch Messung in
20 kurzen Abständen die Änderung des pH-Wertes bei stehendem Medium misst, das Medium danach aus der Messzelle entfernt und mit dem Messzyklus solange wieder von vorne beginnt, bis man die pH-Wert-Änderung über einen längeren Zeitraum bestimmt hat.
- 25 9. Verfahren nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass man das Medium 1 1/2 bis 2 1/2 Minuten lang zuführt und misst und dann mit frischem Medium den Vorgang 14 bis 24 Stunden lang wiederholt.
- 30 10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,

- 11 -

dass man das Verfahren in einem Mehrkanalgerät durchführt, wobei ein Kanal von Medium ohne Cytostatikum beschickt wird und die anderen Kanäle mit dem gleichen Medium, welches das zu untersuchende Cytostatikum enthält, beschickt werden.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/12428

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/50 C12N5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EMBASE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 221 873 B1 (HAJDUCH MARIAN ET AL) 24 April 2001 (2001-04-24) column 6, line 14 - line 25	1-5
X	US 6 452 028 B1 (BATCHO ANDREW DAVID ET AL) 17 September 2002 (2002-09-17)	1-5
Y	column 17, line 65 - column 18, line 12 --- -/-	6-10



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 April 2004

Date of mailing of the international search report

19/04/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Jenkins, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/12428

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	METZGER R ET AL: "Towards in vitro prediction of an in vivo cytostatic response of human tumor cells with a fast chemosensitivity assay" TOXICOLOGY, LIMERICK, IR, vol. 166, 14 September 2001 (2001-09-14), pages 97-108, XP002228157 ISSN: 0300-483X the whole document	1-3
Y	page 99, column 2, paragraph 5 -page 199, column 1, paragraph 1 page 101, column 1, paragraph 2 ---	6-10
A	HAFNER FRANK: "Cytosensor(R) Microphysiometer: Technology and recent applications" BIOSENSORS & BIOELECTRONICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, vol. 15, no. 3-4, June 2000 (2000-06), pages 149-158, XP002183725 ISSN: 0956-5663 cited in the application the whole document -----	6-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/12428

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6221873	B1	24-04-2001	AU 753015 B2 03-10-2002
			CA 2231005 A1 04-09-1999
			JP 11322610 A 24-11-1999
			AU 5646598 A 16-09-1999
			US 2002065293 A1 30-05-2002
US 6452028	B1	17-09-2002	US 5939408 A 17-08-1999
			US 6329538 B1 11-12-2001
			AU 723929 B2 07-09-2000
			AU 2357797 A 27-11-1997
			BR 9703384 A 15-09-1998
			CA 2205275 A1 23-11-1997
			CN 1175573 A 11-03-1998
			CZ 9701578 A3 17-12-1997
			EP 0808833 A2 26-11-1997
			HR 970273 A1 30-04-1998
			HU 9700926 A2 28-01-1998
			JP 2859247 B2 17-02-1999
			JP 10045713 A 17-02-1998
			NO 972304 A 24-11-1997
			NZ 314839 A 28-01-2000
			PL 320132 A1 24-11-1997
			SG 70009 A1 25-01-2000
			TR 9700415 A2 21-12-1997
			TW 445252 B 11-07-2001